

# 九龙江河口及厦门污水处理设施抗生素 抗性基因污染分析

何基兵<sup>1,2</sup> 胡安谊<sup>2</sup> 陈猛<sup>3</sup> 胡友彪<sup>1</sup> 于昌平<sup>2\*</sup>

(1. 安徽理工大学 地球与环境学院 安徽 淮南 232001)

(2. 中国科学院城市环境研究所环境与健康重点实验室 福建 厦门 361021)

(3. 厦门大学 环境与生态学院 福建 厦门 361005)

**摘 要:**【目的】近年来由于抗生素的滥用, 导致了多药物抗性超级细菌的产生, 有关抗生素抗性基因(Antibiotic resistance genes, ARGs)在环境介质中分布、迁移和扩散已经引起人们的广泛关注。针对九龙江河口及厦门污水处理设施抗生素抗性基因污染情况开展研究。【方法】通过定性 PCR 研究九龙江河口水体、沉积物和厦门污水处理设施活性污泥中 4 种磺胺类、13 种四环素类 ARGs 及 2 种整合子基因的污染情况, 并选择四环素类 tet(W)基因进行克隆文库测序分析。【结果】除 tet(O)和 tet(S)外, 其他基因均被检出。不同环境介质中的 ARGs 及整合子基因检出率为活性污泥(0.86)>沉积物(0.57)>水体(0.24)。在淡水和淡盐水中, sul(I)、int(1)、tet(A)、tet(C)、tet(E)、tet(M)和 tet(W)的检出率要高于海水, 表明九龙江上游可能是 ARGs 的污染源之一。【结论】主成分分析表明污水处理设施是 ARGs 的高发载体; 沉积物是 ARGs 的稳定载体; 而水体中的 ARGs 易于分解。此外, tet(W)基因克隆文库分析表明, 厦门污水处理设施也可能是九龙江河口及厦门沿岸的 ARG 污染源。

**关键词:** 抗生素抗性基因, PCR, 九龙江河口, 厦门, 污水处理设施

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 41106096); 973 计划前期研究专项(No. 2010CB434802); 中国科学院城市环境与健康重点实验室开放课题基金项目(No. KLUEH201009)

\*通讯作者: Tel: 86-592-6190768; ✉ cpyu@iue.ac.cn

收稿日期: 2012-02-17; 接受日期: 2012-03-02

# Studies on the pollution levels of antibiotic resistance genes in Jiulong River estuary and wastewater treatment plants in Xiamen

HE Ji-Bing<sup>1,2</sup> HU An-Yi<sup>2</sup> CHEN Meng<sup>3</sup> HU You-Biao<sup>1</sup> YU Chang-Ping<sup>2\*</sup>

(1. College of Earth and Environment, Anhui University of Science and Technology, Huainan, Anhui 232001, China)

(2. Key Laboratory of Urban Environment and Health, Institute of Urban Environment, Chinese Academy of Sciences, Xiamen, Fujian 361021, China)

(3. College of the Environment and Ecology, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China )

**Abstract:** [Objective] Recently, as the prevalence of multiple antibiotic resistant bacteria in environments are induced by the extensive use of antibiotics by human, a better understanding of the distribution, transport and dissemination of antibiotic resistance genes (ARGs) in environments is warranted. The objective of this study was to determine the pollution levels of antibiotic resistance genes in Jiulong River estuary and wastewater treatment plants (WWTPs) in Xiamen. [Methods] Polymerase chain reaction (PCR) assays were employed to identify the distribution patterns of four sulfonamide, thirteen tetracycline ARGs and two integron genes in water, sediments of Jiulong River estuary and five activated sludges in WWTPs of Xiamen. Clone libraries of the tet(W) gene were also generated from three sediments of Jiulong River estuary and five WWTPs in Xiamen. [Results] The all ARGs has been detected except tet(O) and tet(S). The results demonstrated that the frequency of detection (FOD) of ARGs and integron genes in environmental samples with the highest FOD in activated sludges (0.86), moderate FOD in sediments (0.57) and the lowest FOD in water (0.24). Furthermore, the FODs of sul(I), int(1), tet(A), tet(C), tet(E), tet(M) and tet(W) were higher in freshwater and brackish water than those in seawater, suggesting that ARGs may be transported from the upstream of Jiulong River. [Conclusion] Principle component analysis also supported the suggestions that WWTPs contained the highest ARGs, and ARGs are enriched in sediments but unstable in water. In addition, the results of tet(W) libraries indicated that WWTPs may be a point source of ARGs into Jiulong River estuary and Xiamen sea.

**Keywords:** Antibiotic resistance genes, PCR, Jiulong River estuary, Xiamen, Wastewater treatment plants

近年来,随着多药物抗性“超级致病细菌”的不断涌现,细菌耐药性和抗生素滥用问题成为人们日益关注的焦点<sup>[1-2]</sup>。目前,抗生素除了被用于人类和动物的疾病治疗,也在水产养殖和畜牧业中作为促长剂而大量使用。调查显示,欧盟1996年使用了约10 200 t 抗生素,其中约一半用于动物

治疗和促进生长<sup>[3]</sup>;美国在2000年生产约16 200 t 抗生素,其中70%用于畜禽养殖<sup>[4]</sup>;在我国,每年生产的金霉素和土霉素分别有750-1 000 t 和5 000-7 000 t 用于畜禽养殖,而每年也有400 t 诺氟沙星和85 t 氧氟沙星用于食用动物<sup>[5]</sup>。抗生素在生产过程中会随废水排放进入江河湖泊中;此

外,在畜牧养殖过程中,药物会以原形或代谢物的形式随排泄物排出,进入土壤或水体中;有研究显示,投放的抗生素只有约 10%被畜禽利用,超过 90%的抗生素最终以母体化合物或降解产物进入环境中<sup>[6]</sup>。

抗生素的滥用不仅导致环境中的化学药物污染,更可能诱导微生物产生抗生素抗性基因(Antibiotic resistance genes, ARGs)。2006 年,Pruden 等<sup>[7]</sup>首度提出将 ARGs 作为一类新型的环境污染物。由于 ARGs 在环境中可持久性残留、迁移,并可通过基因水平转移在菌群间传播,其对环境生态和人类健康危害比抗生素残留更大<sup>[8-9]</sup>,因此监测环境介质中 ARGs 的污染水平并追溯其污染源,已成为环境领域的研究热点之一。国外学者已对环境中的 ARGs 污染现状开展了广泛研究。最近,Storteboom 等<sup>[10-11]</sup>提出对 ARGs 的定性 PCR 分析即可区分 ARGs 特定污染来源的检测方法。LaPara 等<sup>[12]</sup>对 Duluth-Superior 港的水体、沉积物中四环素类 ARGs 和整合子 *int(1)* 基因的定量分析表明,污水处理设施是该区域水环境中 ARGs 的主要污染源。在我国,对环境介质中 ARGs 的研究才刚刚起步,对水环境和污水处理设施中 ARGs 污染情况的报道还较少。杨颖等<sup>[13]</sup>对北江河水中磺胺类和四环素类 ARGs 基因的分布进行了初步调查,发现北江河相对于科罗拉多州北部河流污染更为严重;罗义等<sup>[14]</sup>对海河流域 ARGs 研究表明,磺胺类抗生素可能是诱导海河磺胺类 ARGs 产生的重要因素;张徐祥等<sup>[15]</sup>对国内外 15 个污水处理厂中四环素类 ARGs 进行定性、定量研究,并分析了其中四环素类 ARGs 的遗传多样性。同时,张徐祥等<sup>[16]</sup>也研究了江苏省不同水体以及污水、饮用水处理设施中 *int(1)*、*tet(A)* 和 *tet(C)* 基因的分布趋势。

九龙江是福建省第二大河,全长 258 km,流域面积  $1.4 \times 10^{10} \text{ m}^2$ ,是龙岩、漳州和厦门的主要

饮用水源地。由于畜牧业和水产养殖业的发展,九龙江的抗生素污染较为严重,然而目前尚未有研究关注该区域的 ARGs 污染情况。因此本研究选取九龙江河口及厦门市污水处理设施作为研究对象,通过定性 PCR 方法获得了 4 种磺胺类、13 种四环素类 ARGs 以及 2 种整合子基因的定性结果,在此基础上进行统计分析,并构建四环素类 *tet(W)* 基因的克隆文库进行测序分析。以期为后续的九龙江流域 ARGs 定量和追溯污染来源的研究提供资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集与处理

九龙江河口样品采集于 2011 年 4 月:水样用 Niskin 采水器采集,约 250–500 mL 水样用 0.22  $\mu\text{m}$  聚碳酸酯滤膜(Millipore 公司)过滤,富集微生物;沉积物用抓斗式采泥器采集,置于 50 mL 无菌离心管。共采集了 15 个表层水体样品和 6 个沉积物样品。厦门 5 个污水处理厂活性污泥样品采集于 2010 年 2 月:活性污泥样品采集后放置于 50 mL 无菌离心管。所有样品带回实验室后均低温保存( $-40^\circ\text{C}$ )。图 1 展示了采样位点的地理位置。表 1 展示了九龙江采样点表层水的盐度。

### 1.2 环境基因组 DNA 提取

约 0.5 g 沉积物或活性污泥样品以及 250–500 mL 水样富集滤膜用于环境基因组 DNA 提取。DNA 用 FastDNA spin kit for soil 试剂盒(MP Biomedicals 公司)提取,操作步骤参照产品说明书。DNA 提取完成后用 50  $\mu\text{L}$  无菌水溶解,并低温保存( $-40^\circ\text{C}$ )。DNA 片段大小和质量用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳和 Nanodrop 微量核酸蛋白质分析仪(Thermo Fisher 公司)测定。Quant-iT<sup>TM</sup> dsDNA BR Assay Kit 试剂盒(Molecular Probes 公司)用来进行 DNA 的精确定量,标准品采用 Molecular Probes 公司提供的已知浓度的  $\lambda\text{DNA}$ <sup>[17]</sup>。

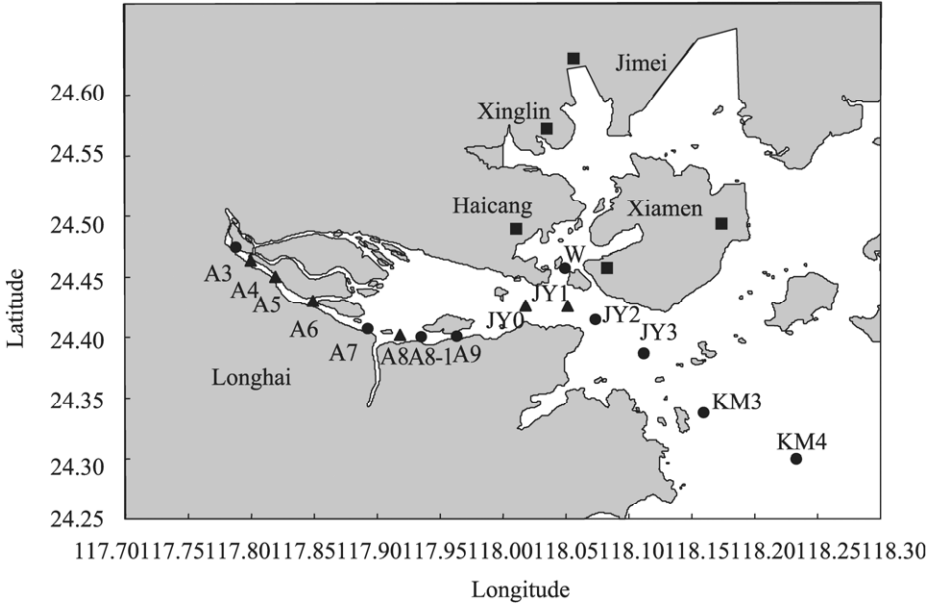


图 1 九龙江河口和厦门污水处理设施采样点分布

Fig. 1 Sample locations along jiulong river and wastewater treatment plants in xiamen

注: ●: 该点只采集了水样; ▲: 该点同时采集了水样和沉积物; ■: 该点为厦门市污水处理设施.

Note: ●: Water samples collected from these locations; ▲: Water and sediment samples collected from these locations; ■: The locations of wastewater treatment plants in Xiamen.

表 1 九龙江采样点表层水盐度  
Table 1 The salinity of sample

采样点 Sample location	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A8-1	A9	W	JY0	JY1	JY2	JY3	KM3	KM4
盐度 Salt concentration	0.2	0.2	0.5	2.8	11.3	19.1	20.7	23.9	26.1	27.4	27.8	27.8	27.8	29.7	30.4

1.3 ARGs 检测

以提取的环境基因组 DNA 为模板(10 倍稀释, 取 1  $\mu$ L 作为模板, 相当于约 1 mg 沉积物(污泥)或约 0.5–1 mL(水样), 用 4 种磺胺类、13 种四环素类 ARGs 及 2 种整合子基因的特异引物(基因种类及引物序列如表 2 所示), PCR 扩增样品中的相应基因。PCR 反应程序如下: 94  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 退火(温度具体见表 2) 45 s, 72  $^{\circ}$ C 45 s, 共 40 个循环; 72  $^{\circ}$ C 7 min。PCR 产物用 2%琼脂

糖凝胶电泳检测, 使用 SYBR<sup>®</sup> Green I 染色。

1.4 tet(W)克隆文库的构建及测序

以 A4s、A6s 和 JY1s 沉积物和 5 个活性污泥的总 DNA 为模板, 用 tet(W)长片段特异引物 tet(W)-FW/tet(W)-1194RV, PCR 扩增样品中的 tet(W)基因。PCR 反应程序如下: 94  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 60  $^{\circ}$ C 45 s, 72  $^{\circ}$ C 1.5 min, 共 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 7 min。PCR 产物用胶纯化试剂盒(Promega 公司)纯化, 纯化后的 PCR 产物用 pMD18-T 试剂

表 2 本研究中用到的 PCR 引物  
Table 2 Details of PCR primers used in this study

目标基因 Target ARGs	引物序列 Sequence of primers	退火温度 Annealing temperature (°C)	产物长度 The length of PCR products (bp)	参考文献 Reference
sul(1)	sul(1)-FW sul(1)-RV	57.5	158	[14]
sul(2)	sul(2)-FW sul(2)-RV	60	190	[14]
sul(3)	sul(3)-FW sul(3)-RV	57	143	[14]
sul(A)	sul(A)-FW sul(A)-RV	58	198	[14]
int(1)	int(1)-FW int(1)-RV	57	146	[14]
int(2)	int(2)-FW int(2)-RV	56	164	[14]
tet(A) <sup>a</sup>	tet(A)-FW tet(A)-RV	61	210	[18]
tet(B) <sup>a</sup>	tet(B)-FW tet(B)-RV	61	206	[18]
tet(C) <sup>a</sup>	tet(C)-FW tet(C)-RV	68	207	[19]
tet(E) <sup>a</sup>	tet(E)-FW tet(E)-RV	61	199	[18]
tet(H) <sup>a</sup>	tet(H)-FW tet(H)-RV	61	186	[19]
tet(L) <sup>a</sup>	tet(L)-FW tet(L)-RV	55	267	[18]
tet(M) <sup>b</sup>	tet(M)-FW tet(M)-RV	55	171	[18]
tet(S) <sup>b</sup>	tet(S)-FW tet(S)-RV	65	667	[20]
tet(O) <sup>b</sup>	tet(O)-FW tet(O)-RV	60	171	[18]
tet(B/P) <sup>b</sup>	tet(B/P)-FW tet(B/P)-RV	46	169	[18]
tet(Q) <sup>b</sup>	tet(Q)-FW tet(Q)-RV	55	169	[18]
tet(T) <sup>b</sup>	tet(T)-FW tet(T)-RV	46	169	[18]
tet(W) <sup>b</sup>	tet(W)-FW tet(W)-RV tet(W)-1194RV	64 60	168 1152	[18] [21]

注: <sup>a</sup>: 泵出基因; <sup>b</sup>: 核糖体保护蛋白基因.

Note: <sup>a</sup>: Gene coding for efflux pump; <sup>b</sup>: Gene coding for ribosomal protection protein.

盒(TaKaRa 公司)进行连接反应,并热激转化至 DH5 $\alpha$  感受态细胞(天根公司),然后涂在含有氨苄青霉素的 LB 平板上,于 37 °C 静置培养 16 h。随机挑选白色克隆,重新纯化培养。用 M13 引物对进行阳性克隆子筛选,每个样品随机挑选 40 个阳性克隆进行测序,测序由北京六合华大基因科技股份有限公司完成。

### 1.5 统计分析

不同环境 ARGs 的分布趋势用主成分方法进行分析。tet(W)克隆文库序列,运用 MOTHUR 软件进行操作分类单元(Operational taxonomic unit, OTU)划分<sup>[22]</sup>, OTU 矩阵导入 PAST V1.92 软件<sup>[23]</sup>以 Bray-Curtis 算法进行聚类分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同环境 ARGs 的分布

图 2 展示了九龙江表层水样、沉积物以及厦门污水处理厂活性污泥中 4 种磺胺类、10 种四环素类 ARGs 以及 2 种整合子基因的 PCR 检出率。总体上, ARGs 及整合子基因的检出率在活性污泥中最高,平均检出率约为 0.86,其次为沉积物样品,其检出率约为 0.57,表层水体中 ARGs 及整合子基因发生率最低(0.24),其中 tet(O)、tet(S)在所有样品中均未有检出, tet(B/P)仅出现于沉积物 JY1 样品,所以这 3 种基因未列出。在检出的基因中,整合子基因 int(1)检出率最高(0.77);其次为磺胺类 sul(1)/(2)基因,两者的检出率均为 0.69。在四环素 ARGs 中, tet(C)和 tet(W)检出率最高,可达 0.65;而 tet(E)、tet(A)和 tet(M)的总检出率也较高,均达到或超过 0.5。

在活性污泥中,各 ARGs 及整合子基因的检出率普遍偏高,有 69%的基因(11 种)的检出率达

到 100%。在沉积物样品中, int(2)、tet(B)、tet(Q)和 tet(T)这 4 种基因没有检出,而 sul(1)/(2)/(3)、tet(C)、tet(E)和 int(1)的检出率为 100%。在九龙江表层水体中, int(2)、tet(B)、tet(Q)和 tet(T)同样没有检出,而其他 ARGs 及整合子基因的检出率均低于沉积物或活性污泥(图 2)。此外,根据盐度将表层水体划分为淡水、淡盐水和海水比较发现, sul(1)、int(1)、tet(A)、tet(C)、tet(E)、tet(M)以及 tet(W)在淡水和淡盐水中的检出率要高于海水,其中 tet(A)和 tet(M)的检出率随着盐度增加而减小。

为了保证定性 PCR 检测结果的可靠性,我们采用了以下 3 个策略进行质控: (1) 与 NCBI 数据库对比我们所采用各基因的引物序列; (2) 实验过程中严格引入阴性对照; (3) 针对多个基因构建克隆文库,随机选取 5–10 个阳性克隆子测序。对 NCBI 数据库的 BLAST 搜索表明,本实验中引物具有极好的专一性;实验过程中未出现假阳性的现象;并且获得 ARG 序列与 NCBI 数据库中相应的 ARGs 或整合子同源性均达 99%以上[表 3,除 tet(T)-JL 序列与 *Streptococcus pyogenes* A498 的 tet(T)基因同源性为 96%]。

### 2.2 ARGs 分布的主成分分析

图 3 显示了 ARGs 分布的主成分分析结果。基于检测到的 ARGs 及整合子基因的频率,主成分分析清楚地表明,活性污泥和九龙江沉积物的 ARGs 污染水平显著高于九龙江表层水体样品。主成分轴 1 (Axis 1)可将活性污泥、沉积物与大部分的水体样品分开,其解释量为 53.8%。而主成分轴 2 (Axis 2)可区分活性污泥与沉积物,其解释量为 13.4%。两轴对 ARG 分布的解释量累计可达 67.2%。

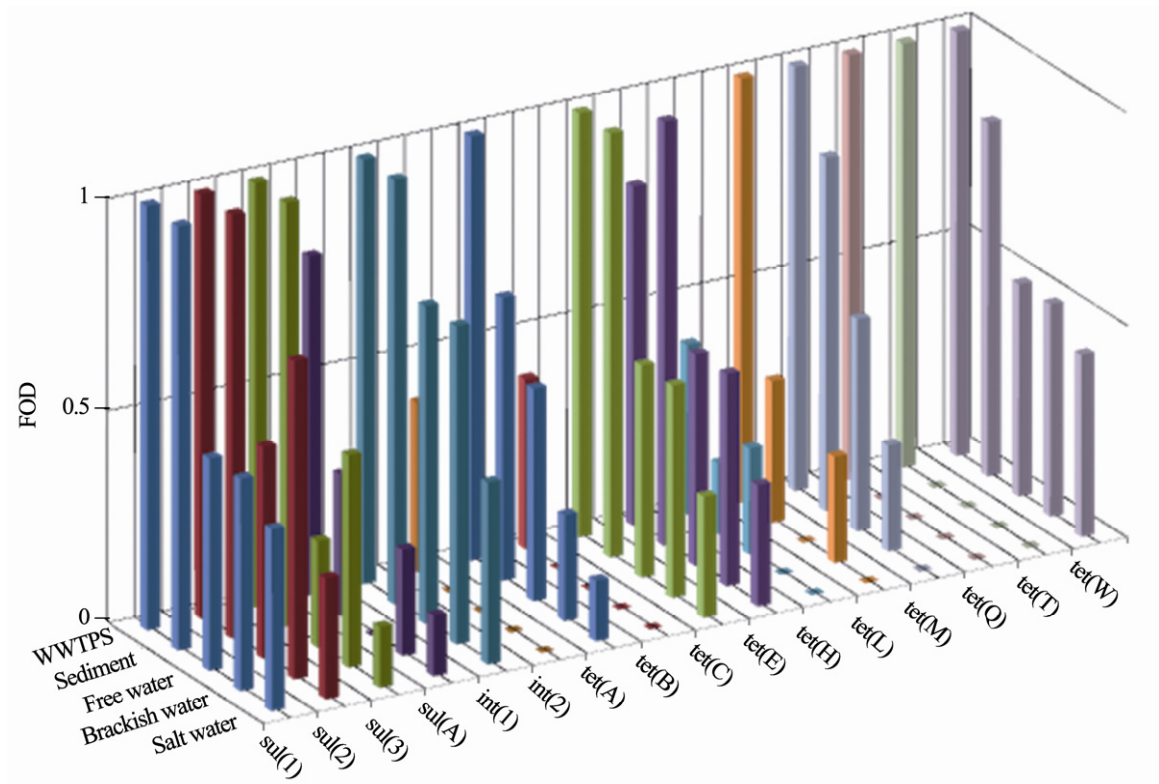


图 2 九龙江河口水体、沉积物和厦门污水处理设施 ARGs 的检出率  
Fig. 2 The frequency of detection of ARGs in water, sediments obtained from jiulong river estuary and wastewater treatment plants in xiamen

表 3 九龙江河口沉积物和厦门污水处理设施中 ARG 序列的 BLAST 分析结果  
Table 3 BLAST analysis of ARG sequences from sediments in jiulong river estuary and WWTPs in xiamen

代表性的克隆子 Representatives of clone	NCBI 数据库中最接近的种或克隆 The most closed species or clone in GenBank	序列号 GenBank accession number	一致性 Identity (%)
int(1)-JL	Uncultured bacterium clone BF7D5HS298MRG292	FJ820128	100
int(2)-JL	Shigella sp. Sh_2011j plasmid	JF313473	99
sul(1)-JL	Providencia stuartii strain PsB/3 plasmid	JN193567	100
sul(2)-JL	Escherichia coli strain S1.2.T2R plasmid pCERC1	JN012467	100
sul(3)-JL	Escherichia coli plasmid pRYC301	HQ875012	100
tet(A)-JL	Escherichia coli strain CW4 plasmid pcw4-EH	JF745030	100
tet(B)-JL	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium plasmid pSRC27	HQ840942	99
tet(C)-JL	Escherichia coli strain 423	EU751610	100
tet(E)-JL	Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida A449 plasmid 4	CP000645	100
tet(H)-JL	Pasteurella multocida strain 706/8p	FR872823	99
tet(M)-JL	Uncultured bacterium clone 159	HE580621	100
tet(Q)-JL	Prevotella nigrescens strain PDRC22B	HM561908	100
tet(T)-JL	Streptococcus pyogenes A498	L42544	96
tet(W)-JL	Clostridium difficile strain C17	FR838949	100

2.3 tet(W)克隆文库分析

为了比较厦门污水处理设施排放对九龙江河口及厦门沿岸 ARGs 分布的可能影响, 进一步构建 5 个活性污泥(WWTP-X1 至 X5)及 3 个沉积物样品(A4s、A6s 和 JY1s) tet(W)基因的克隆文库, 随机挑选阳性克隆子测序后, 共获得了 252 条有效序列。在 1% 的序列分歧度(DNA 水平), MOTHUR 软件将 252 条序列分为 18 个基因型。将每种基因型的序列输入 NCBI 网站, 用 BLASTn 程序与 GenBank 数据库中已有的序列进行比对分析, 比对结果如表 4 所示。

从表 4 可以看出, 九龙江河口和厦门污水处

理设施中 tet(W)序列与人类或动物肠道、脏器、口腔等处分离到的 8 株菌株(其中 4 株是致病菌)携带的 tet(W) 基因高度同源, 相似性达 97%–100%; 而与之相似的环境克隆子 tet(W)序列多来源于污染的自然(动物养殖场污染土壤或水体)或人工环境(活性污泥)(表 4)。

基于 OTU 的聚类分析表明, 这 8 个样品可分为 3 组(图 4): WWTP-X2、X4 和 X5 聚为一簇, 它们之间的平均相似性为 85.4%±1.27%; 九龙江沉积物样品与 WWTP-X1 相似性较高, 约为 82.7%±1.41%; 而 WWTP-X2 是 A4s 的外源分支, 与其他样品的相似性低于 81%。

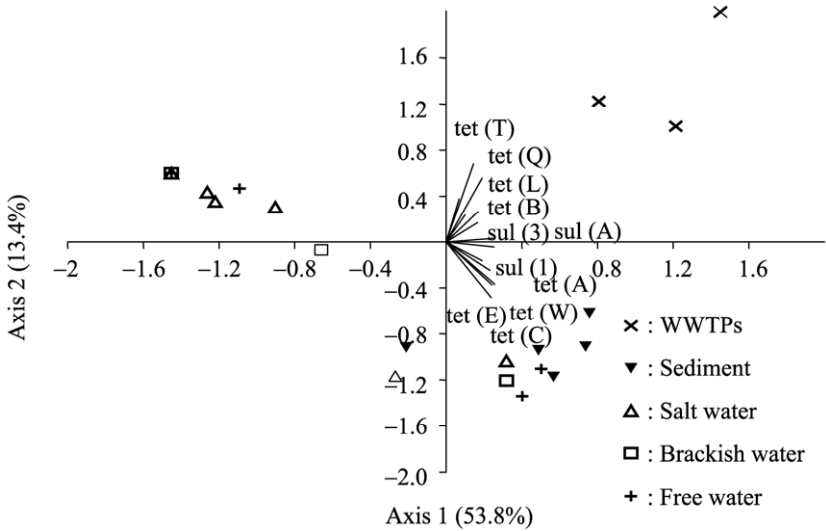


图 3 ARGs 检出率主成分分析

Fig. 3 Principal components analysis based on the frequency of detection of ARGs

表 4 九龙江河口沉积物和厦门污水处理设施中 tet (W)序列的 BLAST 分析  
Table 4 BLAST analysis of tet (W) sequences obtained from sediments in jiulong river estuary and WWTPs in xiamen

代表性的克隆子 Representatives of clone	NCBI 数据库中最接近的种及克隆 The most closed species and clone in GenBank	序列号 GenBank acces- sion number	来源环境 Source environment	一致性 Identity (%)
WWTP-4-16	<i>Clostridium</i> sp. SY8519	AP012212	Human intestine	99
	Clone WW3as-22	GU117043	Activated sludge	99
WWTP-2-39	<i>Clostridium</i> sp. SY8519	AP012212	Human intestine	99
	Clone WW3as-22	GU117043	Activated sludge	99
				(待续)



(续表 4)				
WWTP-2-21	<i>Lactobacillus reuteri</i> SD2112 plasmid pLR581	CP002845	Human gastrointestinal tract	100
	Clone TE2	JN086172	Human fecal matter	100
WWTP-2-9	<i>Lactobacillus reuteri</i> SD2112 plasmid pLR581	CP002845	Human gastrointestinal tract	99
	Clone TE2	JN086172	Human fecal matter	99
JY1s-7	<i>Streptococcus suis</i> strain 45445 <sup>a</sup>	FN396365	Host spleen	99
	Clone IG3-WW3as-2	GU117020	Activated sludge	99
A6s-37	<i>Clostridium</i> sp. SY8519	AP012212	Human intestine	99
	Clone WS-CL-3	DQ309685	Swine farm manure/soil	99
A4s-15	<i>Clostridiales</i> sp. SM4/1	FP929060	Human feces	98
	Clone BF1w-25	GU116874	Beef feedlot lagoon water	99
WWTP-5-13	<i>Lawsonia intracellularis</i> PHE/MN1-00 <sup>a</sup>	AM180252	Sus scrofa	99
	Clone BF1s-21	GU116782	Beef feedlot lagoon water	100
JY1s-13	<i>Rothia</i> sp. T40-1 <sup>a</sup>	EF177463	Human oral cavity	99
	Clone WS-CL-5	DQ309687	Swine farm manure/soil	99
WWTP-1-26	<i>Bifidobacterium thermophilum</i> strain LMG 21813 <sup>a</sup>	EU434753	Pig feces	99
	Clone WS-CL-9	DQ309689	Swine farm manure/soil	99
WWTP-1-22	<i>Rothia</i> sp. T40-1 <sup>a</sup>	EF177463	Human oral cavity	99
	Clone LODw-19	GU116918	Organic dairy lagoon water	99
WWTP-5-29	<i>Roseburia hominis</i> A2-183	CP003040	Human feces	99
	Clone WW3as-52	GU117055	Activated sludge	99
WWTP-1-5	<i>Clostridiales</i> sp. SM4/1	FP929060	Human feces	99
	Clone SCDw-07	GU116937	Conventional dairy lagoon water	99
WWTP-5-38	<i>Lawsonia intracellularis</i> PHE/MN1-00 <sup>a</sup>	AM180252	Sus scrofa	99
	Clone BF1s-21	GU116782	Beef feedlot lagoon water	99
WWTP-3-22	<i>Lactobacillus reuteri</i> SD2112 plasmid pLR581	CP002845	Human gastrointestinal tract	99
	Clone TE2	JN086172	Human fecal matter	99
WWTP-3-32	<i>Rothia</i> sp. T40-1 <sup>a</sup>	EF177463	Human oral cavity	98
	Clone IG7-BF1w-2	GU117029	Beef feedlot lagoon water	98
A4s-24	<i>Clostridiales</i> sp. SM4/1	FP929060	Human feces	97
	Clone BF1w-25	GU116874	Beef feedlot lagoon water	97
WWTP-4-26	<i>Rothia</i> sp. T40-1 <sup>a</sup>	EF177463	Human oral cavity	98
	Clone BF1s-15	GU116779	Beef feedlot lagoon water	99

标注: <sup>a</sup>: 致病菌.

Note: <sup>a</sup>: Pathogenic bacteria.

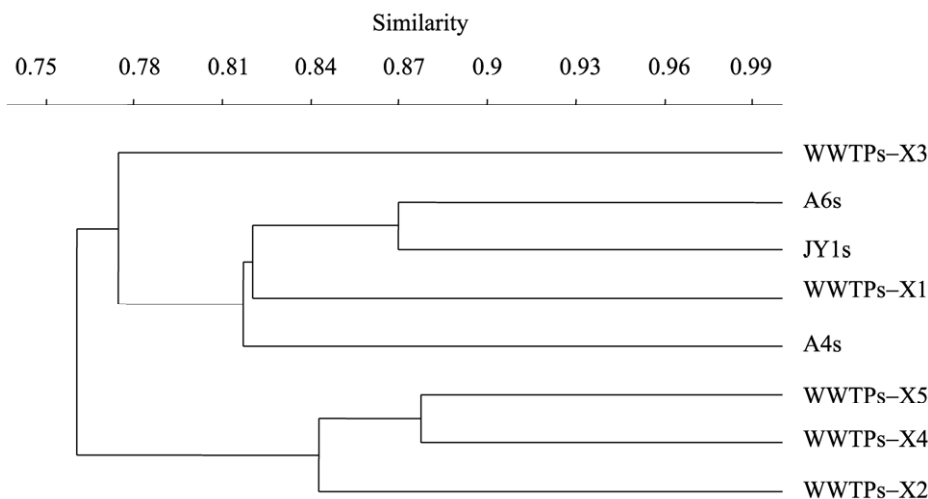


图4 *tet(w)*基因聚类分析

Fig. 4 Cluster analysis of *tet(W)* gene sequences retrieved from the sediments of jiulong river estuary and wastewater treatment plants in Xiamen

### 3 讨论

当前, 抗生素滥用已成为人类广泛关注的社会问题。相对于欧美各国, 我国的抗生素滥用现象更为严重。不当使用抗生素不仅造成抗生素在环境中长期残留, 由此引发的环境生态问题, 如加速 ARGs 的产生、传播及耐药菌的增加更值得关注。由此极有必要开展 ARGs 的环境分布调查。目前监测环境介质中 ARGs 的方法主要有培养法和非培养法。后者主要通过 PCR、定量 PCR 和基因芯片等分子生物学技术评估 ARGs 在自然或人工环境中的分布与丰度<sup>[24]</sup>。由于分子生物学技术可以解析环境中不可培养的微生物, 因此非培养法是当前的检测环境 ARGs 的主流手段。

九龙江是福建省内仅次于闽江的第二大河流。由于九龙江沿岸畜禽以及水产养殖导致水污染问题由来已久<sup>[25]</sup>。经过福建省的长期规划治理措施, 九龙江水质恶化情况已得到初步遏制<sup>[26]</sup>。苏仲毅等<sup>[27]</sup>的研究表明, 九龙江中、下游水体中持续存在多种抗生素, 其来源主要是中、上游区域。然而, 到目前为止, 对于养殖业抗生素滥用

可能诱发的 ARGs 问题仍不太清楚。我们通过定性 PCR、克隆文库、序列测定以及统计分析等手段首次获得了九龙江河口水体和沉积物中 ARGs 的分布数据, 并结合厦门污水处理设施样品探讨了九龙江河口 ARGs 的可能污染源。

定性 PCR 结果表明, 磺胺类 ARGs 尤其是 *sul(1)*和 *sul(2)*是九龙江水样、沉积物以及厦门污水处理设施的出现频率最高的 ARGs 基因, 这个结果与之前的研究报道一致。多项研究表明, 磺胺类 ARGs 广泛分布于水体、沉积物、土壤和污水处理设施等生境, 且丰度较高<sup>[13-14,28-29]</sup>。相对于 13 种四环素类 ARGs, *tet(B/P)*、*tet(S)*在水样、沉积物和活性污泥中均未检出, *tet(O)*仅在 JY1 海水沉积物样品中检出; 而 *tet(A)*、*tet(C)*、*tet(E)*、*tet(M)*和 *tet(W)*是高检出基因。这与之前研究报道略有差别。杨颖等<sup>[13]</sup>在北江河水样中发现, *tet* 泵出基因(*A*)、(*C*)、(*G*)和 *tet* 核糖体保护蛋白基因(*O*)的检出率超过 70%, 而 *tet(E)*和 *tet(S)* 没有检出。张徐祥等<sup>[15]</sup>发现污水处理设施是四环素类 ARGs 的高发载体, 除 *tet(O)*外, 有 13 种 *tet* 相关基因均有检出。此外, 水体、沉积物和活性污泥样品均

分布有高检出率的整合子基因 *int(1)*, 说明该地区的 ARGs 基因在菌群之间的传播风险极大<sup>[30]</sup>。对于这方面的内容有待于进一步的研究深入探讨。

研究表明, 污泥、土壤和沉积物的吸附作用是抗生素尤其是四环素类抗生素进入环境后的重要分配过程<sup>[31-32]</sup>。这一过程虽然消减了抗生素对水环境的生态效应, 但同时也加强了环境选择压力, 使得污泥、土壤和沉积物成为 ARGs 的高发载体<sup>[33]</sup>。对比不同类型样品中 ARGs 的检出率发现, 厦门污水处理设施活性污泥中的 ARGs 检出率最高。这可能是由以下两个原因导致: (1) 污水来源广泛导致 ARGs 频繁输入; (2) 活性污泥中存在的大量微生物为 ARGs 在菌群间传播提供了天然场所。此外, 在沉积物样品中, 沿着盐度梯度, *sul(1)/(2)/(3)*、*tet(C)/(E)*持续被检出, 而水样中的这 5 种 ARGs 检出率最高仅为 0.47 (*sul(1)/(2)*), 进一步支持了我们的假设, 抗生素在沉积物中累积加强了环境选择压力, 使得沉积物中的 ARGs 稳定存在。然而, 这一现象也可能是由于 ARGs 在水体中的不稳定存在(光降解)而导致的<sup>[34]</sup>。

九龙江河口不仅有上游淡水输入, 周期性潮汐周期也可导致海水入侵。海水倒灌可能会将厦门或漳州市排放的污水带入九龙江河口。为了追踪九龙江河口 ARGs 的来源, 我们首先比较了九龙江河口淡水、淡盐水和海水中的 ARGs 检出率, 结果发现淡水和淡盐水的 ARGs 检出率普遍高于海水, 说明上游的 ARGs 可能九龙江中下游的一个重要输入源。此外, *tet(W)*基因克隆文库分析表明, 厦门 1 号和 3 号污水处理设施中存在的 *tet(W)*基因型与九龙江河口沉积物中基因型更为类似(图 4)。而 1 号和 3 号污水处理设施的污水主要排放于厦门西港, 接近 W 站位, 说明下游城市的污水排放同样会给九龙江河口引入外源 ARGs。这一结果对九龙江以及国内其他水域保护计划的实施提供了重要参考资料。

致谢: 感谢厦门大学海洋与地球学院环境管理课题组在九龙江样品采集方面的大力支持; 感谢现场采样工作的洪家俊同学。

## 参 考 文 献

- [1] Dantas G, Sommer MOA, Oluwasegun RD, et al. Bacteria subsisting on antibiotics[J]. *Science*, 2008, 320(5872): 100-103.
- [2] Livermore DM. Has the era of untreatable infections arrived?[J]. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2009, 64(Suppl 1): i29-i36.
- [3] European Union Press Release: Brussels, IP/02/1720[P]. 2002.
- [4] Kools SAE, Moltmann JF, Knacker T. Estimating the use of veterinary medicines in the european union[J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2008, 50(1): 59-65.
- [5] 郑英丽, 周子君. 抗生素滥用的根源、危害及合理使用的策略[J]. *医院管理论坛*, 2007, 24(1): 23-27.
- [6] Halling-Sørensen B, Nors Nielsen S, Lanzky PF, et al. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment: a review[J]. *Chemosphere*, 1998, 36(2): 357-393.
- [7] Pruden A, Pei R, Storteboom H, et al. Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in northern colorado[J]. *Environmental Science and Technology*, 2006, 40(23): 7445-7450.
- [8] Chee-Sanford JC, Mackie RI, Koike S, et al. Fate and transport of antibiotic residues and antibiotic resistance genes following land application of manure waste[J]. *Journal of Environmental Quality*, 2009, 38(3): 1086-1108.
- [9] Engemann CA, Keen PL, Knapp CW, et al. Fate of tetracycline resistance genes in aquatic systems: migration from the water column to peripheral biofilms[J]. *Environmental Science and Technology*, 2008, 42(14): 5131-5136.
- [10] Storteboom H, Arabi M, Davis JG, et al. Identification of antibiotic-resistance-gene molecular signatures suitable as tracers of pristine river, urban, and agricultural sources. *Environmental Science and Technology*, 2010,

- 44(6): 1947–1953.
- [11] Storteboom H, Arabi M, Davis JG, et al. Tracking antibiotic resistance genes in the south platte river basin using molecular signatures of urban, agricultural, and pristine sources[J]. Environmental Science and Technology, 2010, 44(19): 7397–7404.
- [12] LaPara TM, Burch TR, McNamara PJ, et al. Tertiary-treated municipal wastewater is a significant point source of antibiotic resistance genes into duluth-superior harbor[J]. Environmental Science and Technology, 2011, 45(22): 9543–9549.
- [13] 杨颖. 北江水环境中抗生素抗性基因污染分析[D]. 广州: 中山大学硕士学位论文, 2010.
- [14] Luo Y, Mao DQ, Rysz M, et al. Trends in antibiotic resistance genes occurrence in the Haihe River, China[J]. Environmental Science and Technology, 2010, 44(19): 7220–7225.
- [15] Zhang XX, Zhang T. Occurrence, abundance, and diversity of tetracycline resistance genes in 15 sewage treatment plants across China and other global locations[J]. Environmental Science and Technology, 2011, 45(7): 2598–2604.
- [16] Zhang XX, Wu B, Zhang Y, et al. Class 1 integronase gene and tetracycline resistance genes *tetA* and *tetC* in different water environments of Jiangsu province, China[J]. Ecotoxicology, 2009, 18(6): 652–660.
- [17] Hu AY, Jiao NZ, Zhang R, et al. Niche partitioning of marine group I crenarchaeota in the euphotic and upper mesopelagic zones of the East China sea[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(21): 7469–7478.
- [18] Aminov RI, Chee-Sanford JC, Garrigues N, et al. Development, validation, and application of PCR primers for detection of tetracycline efflux genes of gram-negative bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(4): 1786–1793.
- [19] Aminov RI, Garrigues-Jeanjean N, Mackie RI. Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(1): 22–32.
- [20] Ng LK, Martin I, Alfa M, et al. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes[J]. Molecular and Cellular Probes, 2001, 15(4): 209–215.
- [21] Koike S, Krapac IG, Oliver HD, et al. Monitoring and source tracking of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater adjacent to swine production facilities over a 3-year period[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(15): 4813–48263.
- [22] Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(23): 7537–7541.
- [23] Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis[J]. Palaeontologia Electronica, 2001, 4(1): 1–9.
- [24] Zhang XX, Zhang T, Fang HHP. Antibiotic resistance genes in water environment[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 82(3): 397–414.
- [25] 张玉珍, 洪华生, 曾悦, 等. 九龙江流域畜禽养殖业的生态环境问题及防治对策探讨[J]. 重庆环境科学, 2003, 25(7): 29–31, 34.
- [26] 刘灿, 李蒲河, 李裕华, 等. 九龙江活水会有期[J]. 人民政坛, 2009(10): 26–27.
- [27] 苏仲毅. 环境水样中24种抗生素残留的同时分析方法及其应用研究[D]. 厦门: 厦门大学硕士学位论文, 2008.
- [28] Pei R, Kim SC, Carlson KH, et al. Effect of river landscape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG)[J]. Water Research, 2006, 40(12): 2427–2435.
- [29] McKinney CW, Loftin KA, Meyer MT, et al. Tet and sul antibiotic resistance genes in livestock lagoons of various operation type, configuration, and antibiotic occurrence[J]. Environmental

- Science and Technology, 2010, 44(16): 6102–6109.
- [30] Gillings MR, Duan XJ, Hardwick SA, et al. Gene cassettes encoding resistance to quaternary ammonium compounds: a role in the origin of clinical class 1 integrons? [J]. The ISME Journal, 2009, 3(2): 209–215.
- [31] 俞慎, 王敏, 洪有为. 环境介质中的抗生素及其微生物生态效应 [J]. 生态学报, 2011, 31(15): 4437–4446.
- [32] 刘锋, 陶然, 应光国, 等. 抗生素的环境归宿与生态效应研究进展 [J]. 生态学报, 2010, 30(16): 4503–4511.
- [33] Tamminen M, Karkman A, Löhms A, et al. Tetracycline resistance genes persist at aquaculture farms in the absence of selection pressure [J]. Environmental Science and Technology, 2011, 45(2): 386–391.
- [34] Engemann CA, Adams L, Knapp CW, et al. Disappearance of oxytetracycline resistance genes in aquatic systems [J]. Fems Microbiology Letters, 2006, 263(2): 176–182.

## 征 稿 简 则

### 1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 工业微生物学、海洋微生物学、环境微生物学、基础微生物学、农业微生物学、食品微生物学、兽医微生物学、药物微生物学、医学微生物学、病毒学、酶工程、发酵工程、代谢工程等领域的最新研究成果, 产业化新技术和新进展, 以及微生物学教学研究和改革等。设置的栏目有: 研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、名课课堂、教学与科研成果展示、显微世界、专题专栏、专家论坛、书讯、会讯等。

### 2 投稿方式

投稿时请登录我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>, 点击作者投稿区, 第一次投稿请先注册, 获得用户名和密码, 然后依照提示提交稿件, 详见主页“投稿、征稿须知”。

作者必须在网站投.doc 格式的电子稿, 图与文字编好页码、图号后合成一个文件上传。凡不符合(投稿须知)要求的文稿, 本部恕不受理。

### 3 写作要求

来稿要求论点明确, 数据可靠, 简明通顺, 重点突出。

#### 3.1 图表

文中的图表须清晰简明, 文字叙述应避免与图表重复。所有小图的宽度应小于 8 cm (占半栏), 大图的宽度应小于 17 cm (通栏)。

#### 3.2 参考文献及脚注

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。我刊的参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出, 多于 3 人时列出前 3 人, 后加“等”或“et al.”, 作者姓前、名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名可以缩写, 但必须标准, 不加缩写点, 不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

期刊: [1] 刘杰, 成子强, 史宣玲. SARS 冠状病毒 *nsp14* 基因的克隆和表达 [J]. 微生物学通报, 2007, 34(2): 1–3.

[2] Kajiura H, Mori K, Tobimatsu T, et al. Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase [J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(39): 36514–36519.

图书: [3] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物实验教程 [M]. 北京: 北京大学出版社, 2000: 4.

[4] 董志扬, 张树政, 方宣钧, 等. 海藻的生物合成及抗逆机理//华璐等. 核农学进展 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 115–120.

脚注(正文首页下方):

基金项目: 基金项目(No. )

\*通讯作者: Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 2012-00-00; 接受日期: 2012-00-00

(下转 p.701)